



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b>  <b>C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 93/11262</b>  <b>(43) Date de publication internationale:</b> 10 juin 1993 (10.06.93)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR92/01141 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 3 décembre 1992 (03.12.92)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 91/14996                      4 décembre 1991 (04.12.91)    FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> BERTIN & CIE [FR/FR]; Boîte Postale n°3, F-78373 Plaisir (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> COHEN, Nadine [FR/FR]; 64, rue de Meaux, F-75019 Paris (FR). BOUGUERET, Lydie [FR/FR]; 10, rue Franquet, F-75015 Paris (FR). COHEN, Daniel [FR/FR]; 5, rue Jeanne-D'Arc, F-94160 Saint-Mande (FR). DAUSSET, Jean [FR/FR]; 7, rue Villersexel, F-75007 Paris (FR).		<b>(74) Mandataire:</b> CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).  <b>(81) Etats désignés:</b> AU, CA, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD OF SELECTING AT LEAST ONE MUTATION SCREEN, ITS APPLICATION TO A METHOD FOR RAPID IDENTIFICATION OF ALLELES OF POLYMORPHOUS SYSTEMS AND DEVICE FOR IMPLEMENTATION THEREOF  <b>(54) Titre:</b> PROCÉDE DE SELECTION D'AU MOINS UN CRIBLE DE MUTATIONS, SON APPLICATION A UN PROCÉDE D'IDENTIFICATION RAPIDE D'ALLELES DE SYSTEMES POLYMORPHES ET DISPOSITIF POUR SA MISE EN ŒUVRE  <b>(57) Abstract</b>  <p>Methods of selecting at least one mutation screen from a series of allele sequences of a polymorphous gene and for rapid identification of alleles of polymorphous genes, nucleotide probes obtained from the said mutation screens, placed specifically in data bank form, and a device for implementing the said method are disclosed. The method for identifying alleles consists of: (a) selecting all or part of a known <i>consensus</i> sequence of the said polymorphous gene; (b) creating a mutation matrix for the corresponding sequences of known alleles; (c) identifying indiscernable sequences by comparison in twos (alleles having the same mutation profile in the sequence selected in (a)) and excluding one of the members of the said pairs; (d) identifying and counting the obligatory mutations or allele marker mutations, i.e. those which are necessary and adequate for distinguishing between two alleles which are otherwise identical (set O of obligatory mutations); and (f) obtaining the said minimum mutation screen(s), comprising at least the obligatory mutations of step (e); then (g) selecting from the screen selected in step (f) of the said mutation screen selection process the most suitable mutation screen for preparing oligonucleotide probes suitable for use in differentiating all the alleles; (h) appropriately hybridizing an allele X to be identified with the oligonucleotide probes selected from the mutation screen(s) obtained in steps (a) to (g); and (i) identifying the allele X by detection of the said hybrid(s) which may have been formed in step (h).</p>		

BEST AVAILABLE COPY

(57) Abrégé Procédés de sélection d'au moins un crible de mutations à partir d'un ensemble de séquences alléliques d'un gène polymorphe et d'identification rapide d'allèles de gènes polymorphes, sondes nucléotidiques obtenues à partir desdits cribles de mutations, notamment constitués en banque de données et dispositif pour la mise en œuvre desdits procédés. Le procédé pour l'identification d'allèles comprend: (a) la sélection de tout ou partie d'une séquence *consensus* connue dudit gène polymorphe; (b) la création d'une matrice des mutations des séquences correspondantes d'allèles connus; (c) l'identification des séquences indiscernables par comparaison deux à deux (allèles ayant le même profil de mutations dans la séquence sélectionnée en (a)) et l'exclusion d'un des membres desdits couples; (e) l'identification et le dénombrement des mutations obligatoires ou mutations dites marqueurs d'allèles, c'est-à-dire celles qui sont nécessaires et suffisantes pour la distinction de deux allèles par ailleurs identiques (ensemble O des mutations obligatoires); et (f) l'obtention dudit/desdits cribles minimaux de mutations, comprenant au moins les mutations obligatoires de l'étape (e); puis (g) le choix, parmi les cribles sélectionnés à l'étape (f) dudit procédé de sélection de cribles de mutations, du crible de mutations le plus adapté à la réalisation de sondes oligonucléotidiques aptes à être utilisées pour la différenciation de tous les allèles; (h) une hybridation appropriée d'un allèle X à identifier avec les sondes oligonucléotidiques sélectionnées à partir du/des cribles de mutations établis au cours des étapes (a) à (g); et (i) identification de l'allèle X par détection dudit/desdits hybrides, éventuellement formés au cours de l'étape (h).

#### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brsil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PROCEDE DE SELECTION D'AU MOINS UN CRIBLE DE MUTATIONS, SON APPLICATION A UN PROCEDE D'IDENTIFICATION RAPIDE D'ALLELES DE SYSTEMES POLYMORPHES ET DISPOSITIF POUR SA MISE EN OEUVRE.

5 La présente invention est relative à un procédé de sélection d'au moins un crible de mutations à partir d'un ensemble de séquences alléliques d'un gène polymorphe, à un procédé d'identification rapide de variations alléliques (allèles ou séquences alléliques)  
10 des séquences de gènes polymorphes, à des sondes nucléotidiques obtenues à partir desdits cribles de mutations, notamment constitués en banque de données ainsi qu'à un dispositif pour la mise en oeuvre desdits procédés.

La présente invention est également relative à  
15 un kit pour l'identification des allèles de gènes polymorphes.

A l'heure actuelle, il est très difficile et très fastidieux d'identifier les différents allèles d'un même gène, se distinguant par mutation d'au moins une  
20 base dans leur séquence nucléotidique, notamment dans le cas de systèmes naturellement polyalléliques, tel que le système majeur d'histocompatibilité (HLA) dont les gènes peuvent se présenter sous de très nombreuses formes alléliques, ainsi que dans toute autre forme de polymor-  
25 phisme, notamment ceux dûs à des mutations somatiques comme celles des immunoglobulines et des récepteurs des cellules T ou encore ceux rencontrés dans des systèmes équivalents à un système polyallélique, plus particulièrement observés dans certaines maladies génétiques à  
30 mutations multiples telles que la mucoviscidose ou la dystrophie musculaire de Duchenne.

Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (complexe HLA), par exemple, sont étroitement liés sur le bras court du chromosome 6 et s'étendent sur envi-  
35 ron 5 000 kB ; ils codent pour trois types de protéines, les protéines de classe I, II et III ; une caractéristique majeure du système HLA est son vaste polymorphisme.

Le polymorphisme de ce système résulte du nombre de gènes et du nombre des différents allèles possibles pour chacun de ces gènes, le polymorphisme étant encore accru si l'on tient compte du fait qu'un individu peut avoir reçu le même allèle de ses deux parents (état homozygote) ou peut avoir reçu deux allèles différents (état hétérozygote).

De plus, si l'on considère que pour le complexe HLA, il peut exister de 10 à 100 allèles par gène et qu'on a actuellement caractérisé 15-20 gènes codant pour les protéines du complexe HLA, il est quasiment impossible d'effectuer un typage (ou identification) complet de ce complexe avec les méthodes actuellement disponibles, alors que ce dernier peut se révéler crucial, notamment en transplantation.

En effet, le typage des différents systèmes polymorphes peut être réalisé, actuellement, soit par des méthodes immunochimiques, soit par des techniques d'hybridation ADN/ADN ; toutefois ces techniques ont l'inconvénient :

de ne pas être assez discriminatives, et donc de ne pas permettre la différenciation d'allèles de structures très proches et

de nécessiter l'utilisation d'un nombre élevé de sondes oligonucléotidiques (par exemple : 50-60 sondes environ dans le cas du gène DR $\beta$  du système HLA (voir notamment la nomenclature des facteurs du système HLA, publiée en 1990 dans Immunogenetics, 31, 131-140), qui comporte 56 allèles), et ce, dans la mesure où dans les procédés de typage classique par biologie moléculaire de l'art antérieur, il est effectivement nécessaire de prévoir de l'ordre d'une sonde par allèle pour pouvoir interpréter les résultats.

Or, cette identification est souvent nécessaire soit pour des raisons préventives, soit pour des raisons curatives (thérapie, chirurgie, greffes notamment) ; plus particulièrement, dans le cas du complexe

HLA; la maîtrise d'un système de typage fiable, est rendue nécessaire dans un but préventif par l'existence d'une corrélation entre la susceptibilité à certaines maladies et la fréquence de certains allèles HLA ; et dans  
5 un but curatif par la nécessité d'avoir une compatibilité HLA entre donneur et receveur, en cas de greffe, comme spécifié ci-dessus et dans un but d'identification des individus (criminologie et recherche de paternité notamment).

10 En conséquence, la Demanderesse s'est donné pour but de pourvoir à un procédé d'identification rapide et fiable d'allèles, qui a l'avantage de permettre l'identification de la carte allélique complète d'un sujet, et ce sans nécessiter l'utilisation d'un nombre  
15 élevé de sondes oligonucléotidiques (difficulté de réalisation et coût élevé desdites sondes).

La présente invention a pour objet un procédé pour la sélection, à partir d'un ensemble de séquences alléliques d'un gène polymorphe, d'au moins un crible de  
20 mutations destiné à spécifier au moins une sonde nucléotidique apte à être utilisée pour la discrimination de tous les allèles, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) la sélection de tout ou partie d'une sé-  
25 quence consensus connue dudit gène polymorphe ;

(b) la création d'une matrice des mutations des séquences correspondantes d'allèles connus ;

(c) l'identification des séquences indiscernables par comparaison deux à deux (allèles ayant le même  
30 profil de mutations dans la séquence sélectionnée en (a)) et l'exclusion d'un des membres desdits couples ;

(e) l'identification et le dénombrement des mutations obligatoires ou mutations dites marqueurs d'allèles, c'est-à-dire celles qui sont nécessaires et  
35 suffisantes pour la distinction de deux allèles par ailleurs identiques (ensemble O des mutations obliga-

toires) ; et

(f) l'obtention dudit/desdits cribles minimaux de mutations, comprenant au moins les mutations obligatoires de l'étape (e).

5 Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, préalablement à l'étape (e) d'identification et de dénombrement des mutations obligatoires, ledit procédé comprend :

(d) l'identification des mutations similaires  
10 dans chacune desdites séquences d'allèles de l'étape (b), de manière à ne traiter dans les étapes suivantes que les mutations non redondantes et constituant l'ensemble U des mutations utiles ; laquelle étape (d) est suivie des étapes (e) et (f) modifiées comme suit :

15 (e) l'identification et le dénombrement des mutations obligatoires ou mutations dites marqueurs d'allèles, parmi les mutations utiles de l'ensemble U, c'est-à-dire celles qui sont nécessaires et suffisantes pour la distinction de deux allèles par ailleurs identiques (ensemble O' des mutations obligatoires) ; et  
20

(f) si les mutations obligatoires de l'étape (e) ne permettent pas l'obtention directe de cribles de mutations aptes à la différenciation univoque de tous les allèles, on procède à la sélection d'un nombre minimal de  
25 mutations utiles de l'étape (d) (sous-ensemble  $U_1$  issu de l'ensemble U des mutations utiles) qui, associées aux mutations obligatoires de l'étape (e), forment le/les cribles de mutations aptes à la différenciation univoque de tous les allèles.

30 Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, préalablement à l'étape (f), ledit procédé comprend une étape (x) de sélection de mutations utiles de l'étape (d) (sous-ensemble  $U_2$  issu de l'ensemble U des mutations utiles), pour former un groupe  
35 des mutations utiles les plus adaptées à la réalisation de sondes oligonucléotidiques aptes à être utilisées pour

la différenciation de tous les allèles ; laquelle étape (x) est suivie de l'étape (f) modifiée comme suit :

(f) si les mutations obligatoires ne permettent pas la sélection directe de cribles de mutations aptes à la différenciation univoque de tous les allèles, on procède à la sélection d'un nombre minimal de mutations utiles de l'étape (x) qui, associées aux mutations obligatoires de l'étape (e), forment le/les cribles de mutations aptes à la différenciation univoque de tous les allèles.

De tels cribles de mutations sont particulièrement intéressants pour la sélection et la réalisation d'un nombre restreint de sondes oligonucléotidiques, aptes à être utilisées pour la différenciation de tous les allèles d'un gène polymorphe.

La présente invention a également pour objet un procédé pour l'identification d'allèles (ou séquences alléliques) d'un gène polymorphe, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

I - la sélection d'au moins un crible de mutations réalisé à partir d'un ensemble de séquences alléliques d'un gène polymorphe au cours des étapes :

(a) à (f) du procédé de sélection d'au moins un crible de mutations tel que défini ci-dessus (y compris les différentes variantes) ; puis

(g) le choix, parmi les cribles sélectionnés à l'étape (f) dudit procédé de sélection de cribles de mutations, du crible de mutations le plus adapté à la sélection et à la réalisation de sondes oligonucléotidiques aptes à être utilisées pour la différenciation de tous les allèles ;

II - typage proprement dit d'un allèle X à identifier par :

(h) une hybridation appropriée dudit allèle X avec les sondes oligonucléotidiques sélectionnées à partir du/des cribles de mutations établis au cours des

étapes (a) à (g) ; et

(i) identification de l'allèle X par détection dudit/desdits hybrides, éventuellement formés au cours de l'étape (h).

- 5 De manière avantageuse, lorsque le procédé de sélection de cribles de mutations, comprend l'étape (d) telle que définie ci-dessus, ladite étape (d) a l'avantage d'entraîner une première réduction des mutations à considérer dans la suite des étapes, en éliminant un premier sous-ensemble de mutations (mutations redondantes) et donc de constituer un ensemble U des mutations utiles pour la caractérisation d'un allèle.

Les étapes (e) à (g) ont l'avantage :

- 15 de permettre la sélection d'un sous-ensemble de mutations obligatoires, parmi les mutations utiles de l'ensemble U qui, éventuellement en association avec :

- soit un sous-ensemble  $U_1$ , issu de l'ensemble U des mutations utiles (l'ensemble  $U_1$  correspondant à un nombre minimal de mutations utiles qui, en association avec les mutations obligatoires, forment des cribles de mutations aptes à la différenciation univoque de tous les allèles) ou

20 - soit un sous-ensemble  $U_2$ , issu de l'ensemble U des mutations utiles et sélectionné pour former un groupe de mutations utiles plus adaptées à la réalisation de sondes oligonucléotidiques convenables, forment des cribles de mutations aptes à la différenciation univoque de tous les allèles ; et

30 - de permettre, en raison de la sélection des sondes oligonucléotidiques spécifiques, une identification rapide de l'allèle inconnu.

En effet, le procédé conforme à l'invention permet outre la sélection d'un nombre restreint de sondes oligonucléotidiques, la sélection de sondes ayant les caractéristiques avantageuses suivantes :

- appariement maximal avec la séquence consen-



sus ;

- absence de formation de séquences donnant lieu à la formation d'homo- ou d'hétérodimères non spécifiques ;

- 5                   - contenu important en bases GC ; et  
                  - absence de séquences répétées polypurines ou polypyrimidines.

De plus, le procédé conforme à l'invention permet l'identification directe des doublets homozygotes  
10 et leur différenciation des doublets hétérozygotes.

Dans ce dernier cas, pour établir, *in fine*, le crible de mutations, on met en oeuvre le même procédé que décrit ci-dessus par l'analyse de chaque séquence du doublet à chaque position ; ce sont donc des doublets  
15 d'allèles qui sont comparés à tous les autres doublets d'allèles.

Les implications préventives et curatives de la connaissance précise des allèles portés par un sujet donné sont importantes ; le procédé conforme à l'inven-  
20 tion permet, dans un temps très court, de résoudre ce problème.

La présente invention a également pour objet l'application du procédé pour la sélection d'au moins un crible de mutations à partir d'un ensemble de séquences  
25 alléliques d'un gène polymorphe, à la réalisation d'une banque de données, constituée par l'ensemble des cribles de mutations obtenus par le procédé ci-dessus et destinée à la préparation de sondes oligonucléotidiques aptes à être utilisées pour la discrimination de tous les  
30 allèles.

La présente invention a également pour objet des sondes oligonucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles sont construites pour la mise en oeuvre d'au moins un crible de mutations issu du procédé de sélection

d'au moins un crible de mutations à partir d'un ensemble de séquences alléliques d'un gène polymorphe ou de la banque de données telle que définie ci-dessus, en ce qu'elles comprennent entre 15 et 50 bases et en ce qu'elles sont les plus aptes à s'hybrider à une séquence allélique pour l'identification d'allèles d'un gène polymorphe.

De telles sondes peuvent éventuellement être marquées à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée, un fluorochrome, un anticorps ou un analogue de base ; de telles sondes peuvent également être construites pour être mises en oeuvre dans le procédé de détection et/ou d'identification d'une base nucléotidique spécifique présente sur une séquence d'acide nucléique (mutation) décrit dans la Demande de Brevet européen 412 883, au nom de la Demanderesse.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites sondes, elles comprennent une séquence issue de la séquence *consensus* sélectionnée et dont la base nucléotidique située à l'extrémité 3' correspond à une base en amont d'une des bases mutantes du crible de mutations sélectionné.

La présente invention a également pour objet un kit pour l'identification d'allèles d'un gène polymorphe, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- des quantités appropriées d'une collection de sondes oligonucléotidiques conformes à l'invention ; éventuellement associées à :
- des quantités appropriées d'un réactif de détection des hybrides sonde-séquence à identifier éventuellement formés ; et/ou à
- un tableau d'interprétation du résultat des hybridations obtenues, en fonction du crible de mutations sélectionné.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit kit, lesdites sondes comprennent une séquence issue de la

séquence consensus sélectionnée et dont la base nucléotidique située à l'extrémité 3' correspond à une base en amont d'une des bases mutantes du crible de mutations sélectionné.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit kit, il comprend en outre :

- des quantités appropriées de quatre bases nucléotidiques modifiées, de manière à être incorporables dans le produit d'extension desdites sondes utilisées  
10 comme amorces, tout en bloquant l'élongation dudit produit d'extension.

Un tel mode de réalisation permet la mise en oeuvre du procédé décrit dans la Demande de brevet européen 412 883 au nom de la Demanderesse.

15 La présente invention a, en outre, pour objet un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- des moyens d'entrée de données,  
20 - des moyens de calcul programmés pour générer le/les cribles de mutations,  
- des moyens de mémorisation desdits cribles,  
et

- des moyens aptes à permettre l'identification des allèles à partir des cribles mémorisés.  
25

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'au dessin annexé, dans lequel :  
30

- la figure 1 illustre un mode de réalisation du procédé de sélection d'un crible de mutations dans lequel ledit crible est directement obtenu à partir de l'ensemble O de mutations obligatoires ;

35 - la figure 2 illustre un autre mode de réalisation dans lequel ledit crible est obtenu à partir d'un

ensemble  $O'$  de mutations obligatoires issu d'un ensemble  $U$  de mutations utiles, lequel ensemble  $O'$  est éventuellement associé à un sous-ensemble  $U_1$  ou à un sous-ensemble  $U_2$  de mutations utiles, tels que définis ci-dessus ;

5 - la figure 3 illustre un dispositif de mise en oeuvre des procédés conformes à l'invention (phase de création et phase d'exploitation) ;

- la figure 4 illustre une matrice de mutations d'une séquence à 7 allèles, dénommée  $All$  ;

10 - la figure 5 illustre l'ensemble  $U$  (mutations utiles) en vue d'identifier un couple d'allèles homozygotes de la séquence  $All$  ;

- la figure 6 illustre les cribles de mutations aptes à l'identification univoque de tous les couples d'allèles homozygotes de  $All$  ;

15 - la figure 7 illustre l'ensemble  $U$  (mutations utiles) en vue d'identifier un couple d'allèles hétérozygotes du gène  $All$  ;

- la figure 8 illustre le crible de mutations apte à l'identification univoque de tous les doublets d'allèles hétérozygotes de  $All$  ;

- la figure 9 illustre l'ensemble  $U$  (mutations utiles) en vue d'identifier un couple d'allèles homozygotes du gène  $DQ\beta 1$  ; et

25 - la figure 10 illustre l'ensemble des cribles de mutations aptes à l'identification de tous les couples d'allèles homozygotes du gène  $DQ\beta 1$ .

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

30 Un dispositif conforme à l'invention permet la mise en oeuvre des procédés de sélection et d'identification tels que définis ci-dessus aussi bien en phase de création (constitution des cribles) qu'en phase d'exploitation (identification d'un allèle).

En phase de création, la matrice des mutations d'allèles est introduite en (1) dans un microprocesseur (A) approprié et génèrent en (4) au moyen du procédé de sélection d'au moins un crible de mutations conforme à l'invention, un ensemble de cribles, mémorisés en (3, 3') dans une banque de données ..

En phase d'exploitation, une séquence à identifier est hybridée avec une collection de sondes convenables, construites pour la mise en oeuvre d'au moins un crible de mutations ; à partir des hybrides obtenus, on identifie la séquence (données expérimentales introduites en (2)) ; on compare le résultat obtenu avec le crible en (5), ce qui permet de préciser de quel allèle il s'agit.

**EXEMPLE 1 : Constitution de cribles de mutations des allèles homozygotes du gène All.**

on sélectionne la séquence All\*0501 comme séquence consensus comme visible sur la figure 4, dans laquelle la première séquence est considérée comme la séquence consensus ; dans les autres séquences seules sont indiquées les mutations par rapport à ladite séquence consensus ;

on compare les allèles deux à deux et on identifie les mutations utiles pour différencier chaque couple d'allèles : les mutations utiles trouvées avec le procédé conforme à l'invention sont au nombre de 9 :

5, 8, 14, 19, 20, 21, 36, 48, 49

conformément à la figure 5.

Dans cet exemple, un couple d'allèles est indiscernable (couple All\*0201 et All\*0202) ; l'allèle All\*0202 est en conséquence supprimé pour le reste de l'analyse.

on procède ensuite à la recherche des mutations obligatoires :

All\*0401 et All\*0501 ne diffèrent que par 36.

Il ressort de cette recherche qu'il n'existe qu'une seule position obligatoire parmi les mutations utiles, il s'agit de la position 36.

5 dans le cas présent, la seule mutation obligatoire ne permet pas de discriminer tous les couples d'allèles possibles ; il n'existe pas de "solutions", i.e. de cribles permettant l'identification univoque de tous les allèles considérés, avec un nombre de mutations inférieur à 3 (soit 2 mutations supplémentaires). Tous les cribles de mutations possibles à 3 mutations sont :

- 1) 36, 5, 20
- 2) 36, 8, 20
- 10 3) 36, 14, 20,

conformément aux figures 6.1 à 6.3 et montrent qu'il est possible d'identifier un allèle du gène All à l'aide de l'un quelconque de ces cribles de mutations.

**EXEMPLE 2 : Constitution de cribles de mutations des al-**  
15 **lèles hétérozygotes du gène All.**

Dans cet exemple, après l'exécution des étapes telles que décrites à l'exemple 1, et qui aboutissent à l'identification des mutations utiles comme visible à la figure 7, on procède à la recherche des mutations obliga-  
20 toires qui permettent la discrimination de tous les doublets d'allèles :

- All\*0401, All\*0401 et All\*0501, All\*0401 ne diffèrent que par 36 ;  
All\*0401, All\*0401 et All\*0501, All\*0501 ne diffèrent que  
25 par 36 ;  
All\*0302, All\*0401 et All\*0501, All\*0302 ne diffèrent que par 36 ;  
All\*0301, All\*0401 et All\*0501, All\*0301 ne diffèrent que par 36 ;  
30 All\*0201, All\*0401 et All\*0501, All\*0201 ne diffèrent que par 36 ;  
All\*0502, All\*0401 et All\*0501, All\*0502 ne diffèrent que par 36 ;  
All\*0501, All\*0401 et All\*0501, All\*0501 ne diffèrent que  
35 par 36.

Il ressort de cette recherche qu'il n'existe

une seule position obligatoire parmi les mutations utiles ; il s'agit de la position 36.

Dans cet exemple, cette seule mutation obligatoire ne permet pas de discriminer tous les doublets d'allèles.

- 5 Il n'existe pas de "solutions" avec un nombre inférieur à 3, soit 2 positions supplémentaires. Un des cribles de mutations qui permet la discrimination de tous les doublets d'allèles est : 36, 5, 20, conformément à la figure 8.

10 **EXEMPLE 3 : Typage d'un individu hétérozygote All.**

Le crible de mutations de l'exemple 2 est choisi pour identifier des allèles, car il est le plus adapté à la réalisation de sondes qui répondent aux critères de sélection définis ci-dessus (appariement maximal  
15 avec la séquence consensus, absence de séquences donnant lieu à la formation d'homo- ou d'hétérodimères, contenu important en bases GC et absence de séquences répétées polypurines ou polypyrimidine).

Des sondes de 20 oligonucléotides sont synthé-  
20 tisées de manière à ce que la position 3' desdites sondes correspondent à une base située juste en amont d'une des positions des cribles ci-dessus, de manière à ce que lorsque l'on procède à l'hybridation et à l'extension dans les conditions de la Demande de Brevet européen pré-  
25 citée, on puisse vérifier laquelle/lesquelles des bases s'apparie(nt). L'utilisation d'un tel panel de sondes permet d'identifier

. chez l'individu 1, la séquence CC CT CC qui, en référence au crible choisi permet d'identifier le  
30 couple d'allèles All\*0201, All\*0302, et

. chez l'individu 2 testé, la séquence CC CT CG qui, en référence au crible choisi permet d'identifier le couple d'allèles All\*0502, All\*0201.

**EXEMPLE 4** : Constitution de cribles de mutations des allèles homozygotes du gène HLA-DQ $\beta$ 1

La nomenclature des facteurs du système HLA a été publiée en 1990 dans Immunogenetics, 31, 131-140 et l'exemple qui suit illustre la constitution d'un crible de mutations des allèles du gène HLA-DQ $\beta$ 1, tels que définis dans cet article.

on sélectionne la séquence DQ $\beta$ 1\*0501 (position 1 à position 300) comme séquence consensus ;  
on identifie les positions des mutations similaires, afin de ne les considérer qu'une fois ; on obtient le résultat suivant :

- \* la mutation 25 est similaire à la 7 ;
- \* la mutation 140 est similaire à la 110 ;
- \* la mutation 186 est similaire à la 167 ;
- \* la mutation 266 est similaire à la 250 ;
- \* la mutation 269 est similaire à la 259 ;
- \* la mutation 280 est similaire à la 277 ;

en conséquence, les mutations 25, 140, 186, 266, 269 et 280 sont ignorées dans l'étape suivante du procédé (les numéros correspondent aux positions des mutations sur la séquence).

on compare les allèles deux à deux et on identifie les mutations utiles pour différencier chaque couple d'allèles : les mutations utiles trouvées avec le procédé conforme à l'invention sont au nombre de 54 :

7 26 38 40 57 63 68 75 76 77 81 83 88 89 105 109 110 113  
114 134 137 141 144 147 153 155 158 164 167 169 170 171  
198 199 208 209 211 212 213 216 220 221 223 230 231 234  
250 253 257 259 260 265 271 277, conformément à la figure 9.

Dans cet exemple, tous les couples d'allèles peuvent être différenciés.

on procède ensuite à la recherche des mutations obligatoires :  
DQ $\beta$ 1\*0402 et DQ $\beta$ 1\*0401 ne diffèrent que par 68,



DQ $\beta$ 1\*03032 et DQ $\beta$ 1\*03031 ne diffèrent que par 63,

DQ $\beta$ 1\*03032 et DQ $\beta$ 1\*0302 ne diffèrent que par 170.

Il ressort de cette recherche que les positions obligatoires parmi les mutations utiles sont 63, 68  
5 et 170.

. dans le cas présent, les 3 mutations obligatoires ne permettent pas de discriminer tous les couples d'allèles possibles ; il n'existe pas de solutions avec un nombre de mutations inférieur à 7 (soit 4 mutations  
10 supplémentaires. Tous les cribles de mutations possibles à 7 mutations sont :

- 1- 63, 68, 170, 7, 76, 88, 171,
- 2- 63, 68, 170, 7, 77, 88, 171,
- 3- 63, 68, 170, 26, 76, 88, 171,
- 15 4- 63, 68, 170, 26, 76, 88, 231,
- 5- 63, 68, 170, 26, 77, 88, 171,
- 6- 63, 68, 170, 26, 77, 88, 231,
- 7- 63, 68, 170, 57, 76, 88, 171,
- 8- 63, 68, 170, 57, 77, 88, 171,
- 20 9- 63, 68, 170, 76, 88, 109, 171,
- 10- 63, 68, 170, 76, 88, 113, 171,
- 11- 63, 68, 170, 76, 88, 114, 171,
- 12- 63, 68, 170, 76, 88, 114, 231,
- 13- 63, 68, 170, 76, 88, 134, 171,
- 25 14- 63, 68, 170, 76, 88, 141, 171,
- 15- 63, 68, 170, 76, 88, 141, 231,
- 16- 63, 68, 170, 76, 88, 153, 171,
- 17- 63, 68, 170, 76, 88, 158, 171,
- 18- 63, 68, 170, 76, 88, 158, 231,
- 30 19- 63, 68, 170, 76, 88, 164, 171, et
- 20- 63, 68, 170, 76, 88, 164, 231,

conformément aux figures 10.1 à 10.20 (dans lesquelles l'allèle DQ $\beta$ 1 est représenté par DQB1) et montrent qu'il est possible d'identifier un allèle du gène DQ $\beta$ 1 à l'aide  
35 de l'un quelconque de ces cribles de mutations.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède,

l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

REVENDICATIONS

1') Procédé pour la sélection à partir d'un ensemble de séquences alléliques d'un gène polymorphe, d'au moins un crible de mutations destiné à spécifier au moins une sonde nucléotidique apte à être utilisée pour la discrimination de tous les allèles, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(a) la sélection de tout ou partie d'une séquence consensus connue dudit gène polymorphe ;

(b) la création d'une matrice des mutations des séquences correspondantes d'allèles connus ;

(c) l'identification des séquences indiscernables par comparaison deux à deux (allèles ayant le même profil de mutations dans la séquence sélectionnée en (a)) et l'exclusion d'un des membres desdits couples ;

(e) l'identification et le dénombrement des mutations obligatoires ou mutations dites marqueurs d'allèles, c'est-à-dire celles qui sont nécessaires et suffisantes pour la distinction de deux allèles par ailleurs identiques (ensemble O des mutations obligatoires) ; et

(f) l'obtention dudit/desdits cribles minimaux de mutations, comprenant au moins les mutations obligatoires de l'étape (e).

2') Procédé de sélection selon la revendication 1, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape (e) d'identification et de dénombrement des mutations obligatoires, ledit procédé comprend :

(d) l'identification des mutations similaires dans chacune desdites séquences d'allèles de l'étape (b), de manière à ne traiter dans les étapes suivantes que les mutations non redondantes et constituant l'ensemble U des mutations utiles ; laquelle étape (d) suivie des étapes (e) et (f) modifiées comme suit :

(e) l'identification et le dénombrement des mutations obligatoires ou mutations dites marqueurs

d'allèles, parmi les mutations utiles de l'ensemble U, c'est-à-dire celles qui sont nécessaires et suffisantes pour la distinction de deux allèles par ailleurs identiques (ensemble O' des mutations obligatoires) ; et

5 (f) si les mutations obligatoires de l'étape (e) ne permettent pas l'obtention directe de cribles de mutations aptes à la différenciation univoque de tous les allèles, on procède à la sélection d'un nombre minimal de mutations utiles de l'étape (d) (sous-ensemble  $U_1$  issu de  
10 l'ensemble U des mutations utiles) qui, associées aux mutations obligatoires de l'étape (e), forment le/les cribles de mutations aptes à la différenciation univoque de tous les allèles.

3') Procédé de sélection selon la revendication 2, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape (f), ledit procédé comprend une étape (x) de sélection de mutations utiles de l'étape (d) (sous-ensemble  $U_2$  issu de l'ensemble U des mutations utiles), pour former un groupe  
15 des mutations utiles les plus adaptées à la réalisation de sondes oligonucléotidiques aptes à être utilisées pour la différenciation de tous les allèles ; laquelle étape (x) est suivie de l'étape (f) modifiée comme suit :

(f) si les mutations obligatoires ne permettent pas la sélection directe de cribles de mutations  
25 aptes à la différenciation univoque de tous les allèles, on procède à la sélection d'un nombre minimal de mutations utiles de l'étape (x) qui, associées aux mutations obligatoires de l'étape (e), forment le/les cribles de mutations aptes à la différenciation univoque de tous les  
30 allèles.

4') Procédé pour l'identification d'allèles d'un gène polymorphe, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

I - la sélection d'au moins un crible de mutations réalisé à partir d'un ensemble de séquences allè-  
35

liques d'un gène polymorphe au cours des étapes :

. (a) à (f) du procédé de sélection selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ; puis

5 . (g) le choix, parmi les cribles sélectionnés à l'étape (f) dudit procédé de sélection de cribles de mutations, du crible de mutations le plus adapté à la réalisation de sondes oligonucléotidiques aptes à être utilisées pour la différenciation de tous les allèles ;

10 II - typage proprement dit d'un allèle X à identifier par :

(h) une hybridation appropriée dudit allèle X avec les sondes oligonucléotidiques sélectionnées à partir du/des cribles de mutations établis au cours des étapes (a) à (g) ; et

15 (i) identification de l'allèle X par détection dudit/desdits hybrides, éventuellement formés au cours de l'étape (h).

5') Application du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, à la réalisation d'une  
20 banque de données constituée par l'ensemble des cribles de mutations obtenus par ledit procédé et destinée à la préparation de sondes nucléotidiques aptes à être utilisées pour la discrimination de tous les allèles.

6') Sondes oligonucléotidiques, caractérisées  
25 en ce qu'elles sont construites pour la mise en oeuvre d'au moins un crible de mutations issu du procédé de sélection selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou de la banque de données réalisée selon la revendication 5, en ce qu'elles comprennent entre 15 et 50 bases  
30 et en ce qu'elles sont les plus aptes à s'hybrider à une séquence allélique pour l'identification d'allèles d'un gène polymorphe.

7') Sondes selon la revendication 6, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence issue de  
35 la séquence consensus sélectionnée et dont la base nucléotidique située à l'extrémité 3' correspond à une base

en amont d'une des bases mutantes du crible de mutations sélectionné.

8') Kit pour l'identification d'allèles d'un gène polymorphe, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- des quantités appropriées d'une collection de sondes oligonucléotidiques selon la revendication 6 ou la revendication 7 ; éventuellement associées à :
- des quantités appropriées d'un réactif de détection des hybrides sonde-séquence à identifier éventuellement formés ; et/ou à
- un tableau d'interprétation du résultat des hybridations obtenues, en fonction du crible de mutations sélectionné.

9') Kit selon la revendication 8, caractérisé en ce que lesdites sondes comprennent une séquence issue de la séquence consensus sélectionnée et dont la base nucléotidique située à l'extrémité 3' correspond à une base en amont d'une des bases mutantes du crible de mutations sélectionné.

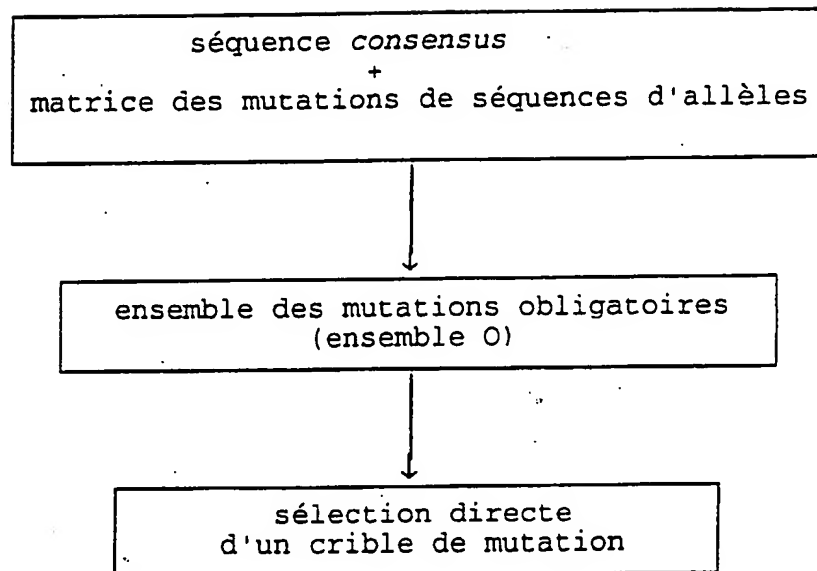
10') Kit selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend en outre :

- des quantités appropriées de quatre bases nucléotidiques modifiées, de manière à être incorporables dans le produit d'extension desdites sondes utilisées comme amorces, tout en bloquant l'élongation dudit produit d'extension.

11') Dispositif pour la mise en oeuvre des procédés selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- des moyens d'entrée de données (1, 2),
- des moyens de calcul programmés pour générer le/les cribles de mutations (4),
- des moyens de mémorisation desdits cribles (3, 3'), et
- des moyens (5) aptes à permettre l'identi-

cation des allèles à partir des cribles mémorisés.

FIGURE 1



2/17

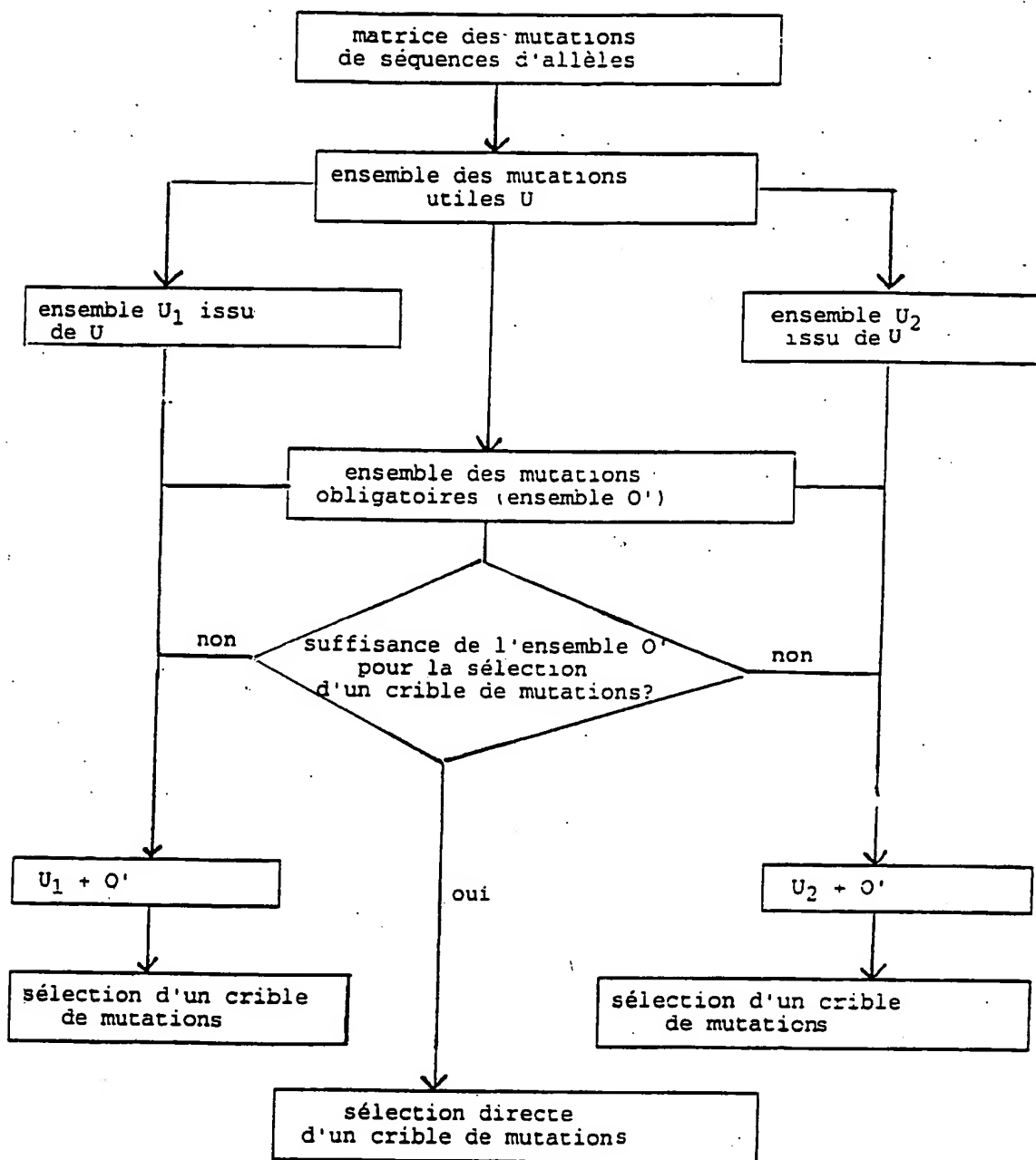
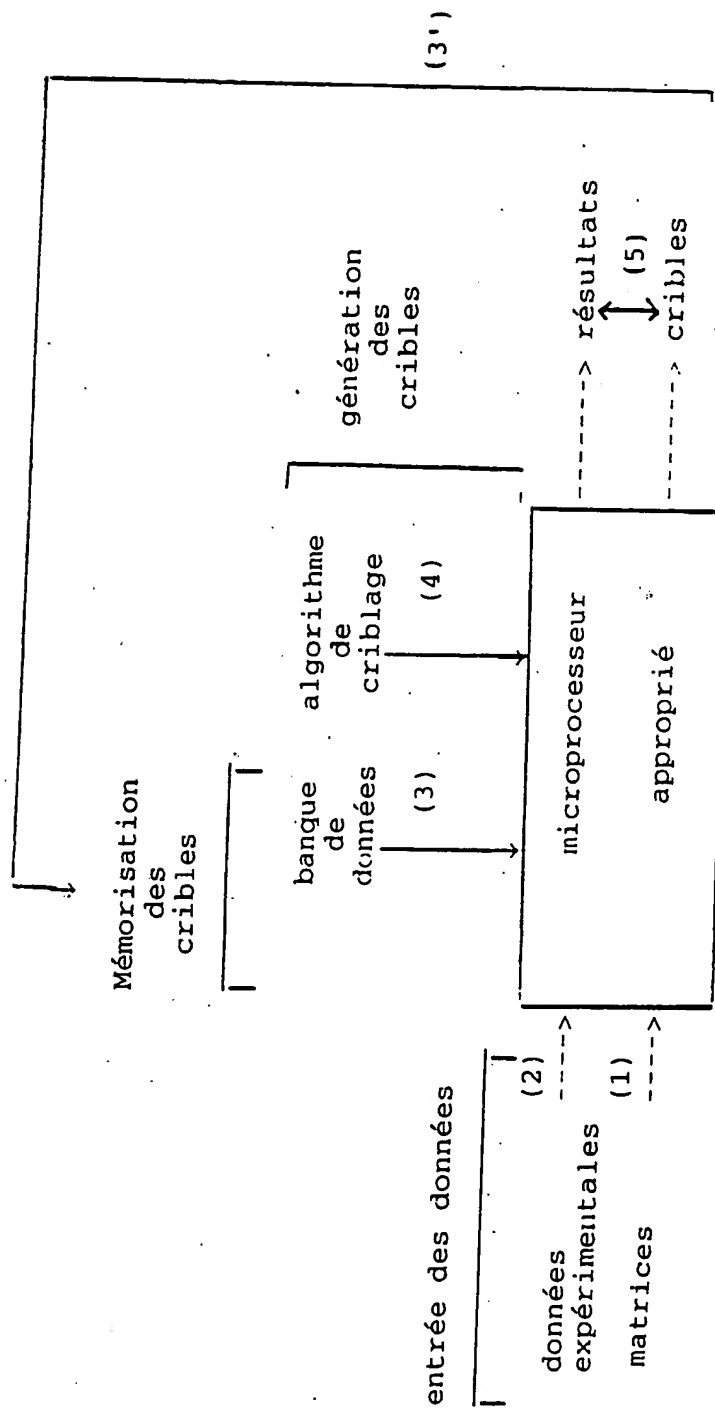


FIGURE 2



A

FIGURE 3

Al1*0501	ACG	COG	CAG	GGG	CGG	OCT	GTT	GOC	GAG	TAC	TOG	AAC	ACC	CAG	AAG	GAA	GTC	CIG
Al1*0502	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Al1*0201	---	-T-	-T-	-T-	-T-	ACC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Al1*0202	---	-T-	-T-	-T-	-T-	CC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Al1*0301	---	-T-	-T-	-T-	-T-	AC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Al1*0302	---	---	-C-	-C-	-C-	CC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Al1*0401	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

FIGURE 4

5	8	14	19	20	21	36	48	49
C	A	G	G	T	T	C	A	G
-	-	-	A	G	C	-	-	-
T	T	T	-	C	C	-	C	A
-	T	T	-	C	C	-	C	A
-	-	C	-	A	C	-	-	-
-	C	C	-	C	C	-	-	-

Al1\*0501  
Al1\*0502  
Al1\*0201  
Al1\*0202  
Al1\*0301  
Al1\*0302  
Al1\*0401

FIGURE 5

5/17

All\*0301  
 All\*0302  
 All\*0502  
 All\*0501  
 All\*0201  
 All\*0202  
 All\*0401

36	5	20
C	C	A
C	C	C
C	C	G
C	C	T
C	T	C
C	T	C
T	C	T

suppr.

FIGURE 6A

Solution :

All\*0502  
 All\*0501  
 All\*0302  
 All\*0301  
 All\*0201  
 All\*0202  
 All\*0401

36	8	20
C	A	G
C	A	T
C	C	C
C	T	A
C	T	C
C	T	C
T	A	T

suppr.

FIGURE 6B

Solution :

All\*0301  
 All\*0302  
 All\*0502  
 All\*0501  
 All\*0201  
 All\*0202  
 All\*0401

36	14	20
C	C	A
C	C	C
C	G	G
C	G	T
C	T	C
C	T	C
T	G	T

suppr.

FIGURE 6C

FIGURE 6

6/17

	5	8	14	19	20	21	36	48	49
All*0501,All*0501	CC	AA	GG	GG	TT	TT	CC	AA	GG
All*0501,All*0502	--	--		AG	GT	CT	--	--	--
All*0501,All*0201	CT	AT	GT	--	CT	CT	--	AC	AG
All*0501,All*0301	--	AT	CG	--	AT	CT	--	--	--
All*0501,All*0302	--	AC	CG	--	CT	CT	--	--	--
All*0501,All*0401	--	--	--	--	--	--	CT	--	--
All*0502,All*0502	--	--	--	AA	GG	CC	--	--	--
All*0502,All*0201	CT	AT	GT	AG	CG	CC	--	AC	AG
All*0502,All*0301	--	AT	CG	AG	AG	CC	--	--	--
All*0502,All*0302	--	AC	CG	AG	CG	CC	--	--	--
All*0502,All*0401	--	--	--	AG	GT	CT	CT	--	--
All*0201,All*0201	TT	TT	TT	--	CC	CC	--	CC	AA
All*0201,All*0301	CT	TT	CT	--	AC	CC	--	AC	AG
All*0201,All*0302	CT	CT	CT	--	CC	CC	--	AC	AG
All*0201,All*0401	CT	AT	GT	--	CT	CT	CT	AC	AG
All*0301,All*0301	--	TT	CC		AA	CC	--	--	--
All*0301,All*0302	--	CT	CC	--	AC	CC	--	--	--
All*0301,All*0401	--	AT	CG	--	AT	CT	CT	--	--
All*0302,All*0302	--	CC	CC	--	CC	CC	--	--	--
All*0302,All*0401	--	AC	CG	--	CT	CT	CT	--	--
All*0401,All*0401	--	--	--	--	--	--	TT	--	--

FIGURE 7

	36	5	20
All*0301,All*0301	CC	CC	AA
All*0301,All*0302	CC	CC	AC
All*0502,All*0301	CC	CC	AG
All*0501,All*0301	CC	CC	AT
All*0302,All*0302	CC	CC	CC
All*0502,All*0302	CC	CC	CG
All*0501,All*0302	CC	CC	CT
All*0502,All*0502	CC	CC	GG
All*0501,All*0502	CC	CC	GT
All*0501,All*0501	CC	CC	TT
All*0201,All*0301	CC	CT	AC
All*0201,All*0302	CC	CT	CC
All*0502,All*0201	CC	CT	CG
All*0501,All*0201	CC	CT	CT
All*0201,All*0201	CC	TT	CC
All*0301,All*0401	CC	CT	AT
All*0302,All*0401	CC	CT	CT
All*0502,All*0401	CC	CT	GT
All*0501,All*0401	CC	CT	TT
All*0201,All*0401	CC	CT	CT
All*0401,All*0401	CC	CT	TT

FIGURE 8

FEUILLE DE REMPLACEMENT

DQB1*0501	TTAGCCGGGGCCAGTATGCTACGACGCGTTCAGGGCCGTGCGGGGCTAGGTCAA
DQB1*0502	- - - - - G - - - - - AGC - - - - - A - - - - -
DQB1*05031	- - - - - T-G - - - - - AC - - - - - A - - - - -
DQB1*05032	* * * * *
DQB1*0504	* * * * *-T-A- - - - - G- - - - - AGC-CA-A-A- - - - - *****
DQB1*0601	CCTCAT--TTA--T--G--T-GC--AC-CAA-A-AGATC--T--T--
DQB1*0602	--T-A--TCT--T--C--CG--A--A--GATC--T--T--
DQB1*0603	--A--TCTA--C--CG--A--A--GATC--T--T--
DQB1*0604	--A--TCTA--C--G--A--A--GATC--G--
DQB1*0605	--TCTA-T--C--G--A--A--GATC--G--
DQB1*0201	--A-A-TCT-GAGAAAT--AT--G-TTT--CC-CAA-AAA-G--CTACTACCTCC
DQB1*0301	*-CA--TTA--T--CAA--G--TC--AC--A-A--GATC--CTACTACCTCC
DQB1*0302	--A--TCT--T--CA--T-G--TC--CC--A-A--GATC--CTACTACCTCC
DQB1*03031	--A-C-TCT--T--CA--T-G--TC--AC--A-A--GATC--CTACTACCTCC
DQB1*03032	--A--TCT--T--CA--T-G--TC--AC--A-A--GATC--CTACTACCTCC
DQB1*0401	--T-A-CT--T--C--T-G--T-T-ACTCA-A-A--CCACTACTACCTCC
DQB1*0402	--T-A-C--T--C--T-G--T-T-ACTCA-A-A--CCACTACTACCTCC

**FIGURE 9**

8/17

FIGURE 10

Solution:

	63	68	170	7	76	88	171
DQB1*0201	A	G	C	T	C	A	C
DQB1*03031	C	G	A	T	C	T	C
DQB1*0402	C	G	A	T	G	T	C
DQB1*0401	C	T	A	T	G	T	C
DQB1*0601	G	G	A	C	T	T	C
DQB1*0603	G	G	A	T	C	C	T
DQB1*03032	G	G	A	T	C	T	C
DQB1*0602	G	G	A	T	C	T	C
DQB1*05031	G	G	A	T	G	C	C
DQB1*05032	G	G	A	*	G	C	T
DQB1*0301	G	G	A	*	T	T	C
DQB1*0302	G	G	C	T	C	T	C
DQB1*0502	G	G	G	T	G	C	C
DQB1*0504	G	G	G	*	G	T	C
DQB1*0604	G	G	T	T	C	C	T
DQB1*0605	G	G	T	T	C	T	T
DQB1*0501	G	G	T	T	G	C	T

10.1

Solution:

	63	68	170	7	77	88	171
DQB1*0201	A	G	C	T	T	A	C
DQB1*0402	C	G	A	T	G	T	C
DQB1*03031	C	G	A	T	T	T	C
DQB1*0401	C	T	A	T	G	T	C
DQB1*0601	G	G	A	C	A	T	C
DQB1*0301	G	G	A	*	A	T	C
DQB1*05031	G	G	A	T	G	C	C
DQB1*05032	G	G	A	*	G	C	T
DQB1*0603	G	G	A	T	T	C	T
DQB1*03032	G	G	A	T	T	T	C
DQB1*0602	G	G	A	T	T	T	T
DQB1*0302	G	G	C	T	T	T	C
DQB1*0502	G	G	G	T	G	C	C
DQB1*0504	G	G	G	*	G	T	C
DQB1*0501	G	G	T	T	G	C	T
DQB1*0604	G	G	T	T	T	C	T
DQB1*0605	G	G	T	T	T	T	T

10.2

9/17

Solution:

	63	68	170	26	76	88	171	
DQB1*0201	A	G	C	A	C	A	C	
DQB1*03031	C	G	A	A	C	T	C	
DQB1*0402	C	G	A	T	G	T	C	
DQB1*0401	C	T	A	T	G	T	C	
DQB1*0603	G	G	A	A	C	C	T	10.3
DQB1*03032	G	G	A	A	C	T	C	
DQB1*05031	G	G	A	A	G	C	C	
DQB1*05032	G	G	A	*	G	C	T	
DQB1*0301	G	G	A	A	T	T	T	
DQB1*0602	G	G	A	T	C	T	T	
DQB1*0601	G	G	A	T	T	T	C	
DQB1*0302	G	G	C	A	C	T	C	
DQB1*0502	G	G	G	A	G	C	C	
DQB1*0504	G	G	G	*	G	T	C	
DQB1*0604	G	G	T	A	C	C	T	
DQB1*0605	G	G	T	A	C	T	T	
DQB1*0501	G	G	T	A	G	C	T	

Solution:

	63	68	170	26	76	88	231	
DQB1*0201	A	G	C	A	C	A	G	
DQB1*03031	C	G	A	A	C	T	G	
DQB1*0402	C	G	A	T	G	T	C	
DQB1*0401	C	T	A	T	G	T	C	
DQB1*0603	G	G	A	A	C	C	G	10.4
DQB1*03032	G	G	A	A	C	T	G	
DQB1*05031	G	G	A	A	G	C	A	
DQB1*05032	G	G	A	*	G	C	*	
DQB1*0301	G	G	A	A	T	T	G	
DQB1*0602	G	G	A	T	C	T	G	
DQB1*0601	G	G	A	T	T	T	G	
DQB1*0302	G	G	C	A	C	T	G	
DQB1*0502	G	G	G	A	G	C	A	
DQB1*0504	G	G	G	*	G	T	G	
DQB1*0604	G	G	T	A	C	C	G	
DQB1*0605	G	G	T	A	C	T	G	
DQB1*0501	G	G	T	A	G	C	G	



10/17

Solution:

	63	68	170	26	77	88	171	
DQB1*0201	A	G	C	A	T	A	C	
DQB1*03031	C	G	A	A	T	T	C	
DQB1*0402	C	G	A	T	G	T	C	
DQB1*0401	C	T	A	T	G	T	C	
DQB1*0301	G	G	A	A	A	T	C	
DQB1*05031	G	G	A	A	G	C	C	
DQB1*05032	G	G	A	*	G	C	T	
DQB1*0603	G	G	A	A	T	C	T	10.5
DQB1*03032	G	G	A	A	T	T	C	
DQB1*0601	G	G	A	T	A	T	C	
DQB1*0602	G	G	A	T	T	T	T	
DQB1*0302	G	G	C	A	T	T	C	
DQB1*0502	G	G	G	A	G	C	C	
DQB1*0504	G	G	G	*	G	T	C	
DQB1*0501	G	G	T	A	G	C	T	
DQB1*0604	G	G	T	A	T	C	T	
DQB1*0605	G	G	T	A	T	T	T	

Solution:

	63	68	170	26	77	88	231	
DQB1*0201	A	G	C	A	T	A	G	
DQB1*03031	C	G	A	A	T	T	G	
DQB1*0402	C	G	A	T	G	T	C	
DQB1*0401	C	T	A	T	G	T	C	
DQB1*0301	G	G	A	A	A	T	G	
DQB1*05031	G	G	A	A	G	C	A	
DQB1*05032	G	G	A	*	G	C	*	
DQB1*0603	G	G	A	A	T	C	G	
DQB1*03032	G	G	A	A	T	T	G	
DQB1*0601	G	G	A	T	A	T	G	
DQB1*0602	G	G	A	T	T	T	G	
DQB1*0302	G	G	C	A	T	T	G	
DQB1*0502	G	G	G	A	G	C	A	
DQB1*0504	G	G	G	*	G	T	G	
DQB1*0501	G	G	T	A	G	C	G	
DQB1*0604	G	G	T	A	T	C	G	
DQB1*0605	G	G	T	A	T	T	G	

11/17

Solution:

	63	68	170	57	76	88	171	
DQB1*0201	A	G	C	C	C	A	C	
DQB1*03031	C	G	A	C	C	T	C	
DQB1*0402	C	G	A	C	G	T	C	10.7
DQB1*0401	C	T	A	C	G	T	C	
DQB1*0603	G	G	A	C	C	C	T	
DQB1*03032	G	G	A	C	C	T	C	
DQB1*0602	G	G	A	C	C	T	T	
DQB1*05031	G	G	A	C	G	C	C	
DQB1*05032	G	G	A	*	G	C	T	
DQB1*0301	G	G	A	C	T	T	C	
DQB1*0601	G	G	A	T	T	T	C	
DQB1*0302	G	G	C	C	C	T	C	
DQB1*0502	G	G	G	C	G	C	C	
DQB1*0504	G	G	G	*	G	T	C	
DQB1*0604	G	G	T	C	C	C	T	
DQB1*0605	G	G	T	C	C	T	T	
DQB1*0501	G	G	T	C	G	C	T	

Solution:

	63	68	170	57	77	88	171	
DQB1*0201	A	G	C	C	T	A	C	
DQB1*0402	C	G	A	C	G	T	C	
DQB1*03031	C	G	A	C	T	T	C	
DQB1*0401	C	T	A	C	G	T	C	
DQB1*0301	G	G	A	C	A	T	C	
DQB1*05031	G	G	A	C	G	C	C	
DQB1*05032	G	G	A	*	G	C	T	
DQB1*0603	G	G	A	C	T	C	T	10.8
DQB1*03032	G	G	A	C	T	T	C	
DQB1*0602	G	G	A	C	T	T	T	
DQB1*0601	G	G	A	T	A	T	C	
DQB1*0302	G	G	C	C	T	T	C	
DQB1*0502	G	G	G	C	G	C	C	
DQB1*0504	G	G	G	*	G	T	C	
DQB1*0501	G	G	T	C	G	C	T	
DQB1*0604	G	G	T	C	T	C	T	
DQB1*0605	G	G	T	C	T	T	T	

12/17

Solution:

	63	68	170	76	88	109	171
DQB1*0201	A	G	C	C	A	A	C
DQB1*03031	C	G	A	C	T	T	C
DQB1*0402	C	T	A	G	T	T	C
DQB1*0401	C	G	A	C	C	T	T
DQB1*0603	G	G	A	C	T	T	C
DQB1*03032	G	G	A	C	T	T	C
DQB1*0602	G	G	A	G	C	T	C
DQB1*05031	G	G	A	G	C	T	C
DQB1*05032	G	G	A	T	C	G	C
DQB1*0601	G	G	A	T	T	T	C
DQB1*0301	G	G	C	C	T	T	C
DQB1*0302	G	G	G	G	C	T	C
DQB1*0502	G	G	G	G	T	T	C
DQB1*0504	G	G	T	C	C	T	T
DQB1*0604	G	G	T	C	T	T	T
DQB1*0605	G	G	T	G	C	T	T
DQB1*0501	G	G	T	G	C	T	T

10.9

Solution:

	63	68	170	76	88	113	171
DQB1*0201	A	G	C	C	A	T	C
DQB1*03031	C	G	A	C	T	C	C
DQB1*0402	C	T	A	G	T	C	C
DQB1*0401	C	G	A	C	C	C	T
DQB1*0603	G	G	A	C	T	C	C
DQB1*03032	G	G	A	C	T	C	T
DQB1*0602	G	G	A	C	T	C	C
DQB1*05031	G	G	A	G	C	T	T
DQB1*05032	G	G	A	T	T	C	C
DQB1*0301	G	G	A	T	T	C	C
DQB1*0601	G	G	A	C	T	C	C
DQB1*0302	G	G	C	C	T	C	C
DQB1*0502	G	G	G	G	C	T	C
DQB1*0504	G	G	T	G	T	C	T
DQB1*0604	G	G	T	C	T	C	T
DQB1*0605	G	G	T	C	T	C	T
DQB1*0501	G	G	T	G	C	T	T

10.10

13/17

Solution:

	63	68	170	76	88	114	171
DQB1*0201	A	G	C	C	A	G	C
DQB1*03031	C	G	A	C	T	A	C
DQB1*0402	C	G	A	G	T	G	C
DQB1*0401	C	T	A	G	T	G	C
DQB1*0603	G	G	A	C	C	G	T
DQB1*03032	G	G	A	C	T	A	C
DQB1*0602	G	G	A	C	T	G	T
DQB1*05031	G	G	A	G	C	G	C
DQB1*05032	G	G	A	G	C	G	C
DQB1*0301	G	G	A	T	T	A	C
DQB1*0601	G	G	A	T	T	G	C
DQB1*0302	G	G	C	C	T	A	C
DQB1*0502	G	G	G	G	C	G	C
DQB1*0504	G	G	G	G	T	G	C
DQB1*0604	G	G	T	C	C	G	T
DQB1*0605	G	G	T	C	T	G	T
DQB1*0501	G	G	T	G	C	G	T

10.11

Solution:

	63	68	170	76	88	114	231
DQB1*0201	A	G	C	C	A	G	G
DQB1*03031	C	G	A	C	T	A	G
DQB1*0402	C	G	A	G	T	G	C
DQB1*0401	C	T	A	G	T	G	C
DQB1*0603	G	G	A	C	C	G	G
DQB1*03032	G	G	A	C	T	A	G
DQB1*0602	G	G	A	C	T	G	G
DQB1*05031	G	G	A	G	C	G	A
DQB1*05032	G	G	A	G	C	G	*
DQB1*0301	G	G	A	T	T	A	G
DQB1*0601	G	G	A	T	T	G	G
DQB1*0302	G	G	C	C	T	A	G
DQB1*0502	G	G	G	G	C	G	A
DQB1*0504	G	G	G	G	T	G	G
DQB1*0604	G	G	T	C	C	G	G
DQB1*0605	G	G	T	C	T	G	G
DQB1*0501	G	G	T	G	C	G	G

10.12

14/17

Solution:

	63	68	170	76	88	134	171	
DQB1*0201	A	G	C	C	A	G	C	
DQB1*03031	C	G	A	C	T	G	C	
DQB1*0402	C	G	A	G	T	G	C	
DQB1*0401	C	T	A	G	T	G	C	
DQB1*0603	G	G	A	C	C	G	T	
DQB1*03032	G	G	A	C	T	G	C	
DQB1*0602	G	G	A	C	T	G	T	
DQB1*05031	G	G	A	G	C	G	C	
DQB1*05032	G	G	A	G	C	G	T	10.13
DQB1*0301	G	G	A	T	T	A	C	
DQB1*0601	G	G	A	T	T	G	C	
DQB1*0302	G	G	C	C	T	G	C	
DQB1*0502	G	G	G	G	C	G	C	
DQB1*0504	G	G	G	G	T	G	C	
DQB1*0604	G	G	T	C	C	G	T	
DQB1*0605	G	G	T	C	T	G	T	
DQB1*0501	G	G	T	G	C	G	T	

Solution:

	63	68	170	76	88	141	171	
DQB1*0201	A	G	C	C	A	C	C	
DQB1*03031	C	G	A	C	T	T	C	
DQB1*0402	C	G	A	G	T	T	C	
DQB1*0401	C	T	A	G	T	T	C	
DQB1*0603	G	G	A	C	C	C	T	
DQB1*0602	G	G	A	C	T	C	T	
DQB1*03032	G	G	A	C	T	T	C	
DQB1*05031	G	G	A	G	C	T	C	
DQB1*05032	G	G	A	G	C	T	T	
DQB1*0301	G	G	A	T	T	C	C	
DQB1*0601	G	G	A	T	T	T	C	
DQB1*0302	G	G	C	C	T	T	C	
DQB1*0502	G	G	G	G	C	C	C	
DQB1*0504	G	G	G	G	T	C	C	
DQB1*0604	G	G	T	C	C	C	T	
DQB1*0605	G	G	T	C	T	C	T	
DQB1*0501	G	G	T	G	C	C	T	

15/17

Solution:

	63	68	170	76	88	141	231	
DQB1*0201	A	G	C	C	A	C	G	
DQB1*03031	C	G	A	C	T	T	G	
DQB1*0402	C	G	A	G	T	T	C	
DQB1*0401	C	T	A	G	T	T	C	10.15
DQB1*0603	G	G	A	C	C	C	G	
DQB1*0602	G	G	A	C	T	C	G	
DQB1*03032	G	G	A	C	T	T	G	
DQB1*05031	G	G	A	G	C	T	A	
DQB1*05032	G	G	A	G	C	T	*	
DQB1*0301	G	G	A	T	T	C	G	
DQB1*0601	G	G	A	T	T	T	G	
DQB1*0302	G	G	C	C	T	T	G	
DQB1*0502	G	G	G	G	C	C	A	
DQB1*0504	G	G	G	G	T	C	G	
DQB1*0604	G	G	T	C	C	C	G	
DQB1*0605	G	G	T	C	T	C	G	
DQB1*0501	G	G	T	G	C	C	G	

Solution:

	63	68	170	76	88	153	171	
DQB1*0201	A	G	C	C	A	G	C	
DQB1*03031	C	G	A	C	T	G	C	
DQB1*0402	C	G	A	G	T	G	C	
DQB1*0401	C	T	A	G	T	G	C	10.16
DQB1*0603	G	G	A	C	C	G	T	
DQB1*03032	G	G	A	C	T	G	C	
DQB1*0602	G	G	A	C	T	G	T	
DQB1*05031	G	G	A	G	C	G	C	
DQB1*05032	G	G	A	G	C	G	T	
DQB1*0601	G	G	A	T	T	C	C	
DQB1*0301	G	G	A	T	T	G	C	
DQB1*0302	G	G	C	C	T	G	C	
DQB1*0502	G	G	G	G	C	G	C	
DQB1*0504	G	G	G	G	T	G	C	
DQB1*0604	G	G	T	C	C	G	T	
DQB1*0605	G	G	T	C	T	G	T	
DQB1*0501	G	G	T	G	C	G	T	

16/17

Solution:

	63	68	170	76	88	158	171
DQB1*0201	A	G	C	C	A	T	C
DQB1*03031	C	G	A	C	T	T	C
DQB1*0402	C	G	A	G	T	T	C
DQB1*0401	C	T	A	G	T	T	C
DQB1*0603	G	G	A	C	C	A	T
DQB1*0602	G	G	A	C	T	A	T
DQB1*03032	G	G	A	C	T	T	C
DQB1*05031	G	G	A	G	C	A	C
DQB1*05032	G	G	A	G	C	A	T
DQB1*0601	G	G	A	T	T	A	C
DQB1*0301	G	G	A	T	T	T	C
DQB1*0302	G	G	C	C	T	T	C
DQB1*0502	G	G	G	G	C	A	C
DQB1*0504	G	G	G	G	T	A	C
DQB1*0604	G	G	T	C	C	A	T
DQB1*0605	G	G	T	C	T	A	T
DQB1*0501	G	G	T	G	C	A	T

10.17

Solution:

	63	68	170	76	88	158	231
DQB1*0201	A	G	C	C	A	T	G
DQB1*03031	C	G	A	C	T	T	G
DQB1*0402	C	G	A	G	T	T	C
DQB1*0401	C	T	A	G	T	T	C
DQB1*0603	G	G	A	C	C	A	G
DQB1*0602	G	G	A	C	T	A	G
DQB1*03032	G	G	A	C	T	T	G
DQB1*05031	G	G	A	G	C	A	A
DQB1*05032	G	G	A	G	C	A	*
DQB1*0601	G	G	A	T	T	A	G
DQB1*0301	G	G	A	T	T	T	G
DQB1*0302	G	G	C	C	T	T	G
DQB1*0502	G	G	G	G	C	A	A
DQB1*0504	G	G	G	G	T	A	G
DQB1*0604	G	G	T	C	C	A	G
DQB1*0605	G	G	T	C	T	A	G
DQB1*0501	G	G	T	G	C	A	G

10.18

17/17

Solution:

	63	68	170	76	88	164	171
DQB1*0201	A	G	C	C	A	T	C
DQB1*03031	C	G	A	C	T	C	C
DQB1*0402	C	G	A	G	T	G	C
DQB1*0401	C	T	A	G	T	G	C
DQB1*0603	G	G	A	C	C	G	T
DQB1*03032	G	G	A	C	T	C	C
DQB1*0602	G	G	A	C	T	G	T
DQB1*05031	G	G	A	G	C	G	C
DQB1*05032	G	G	A	G	C	G	T
DQB1*0301	G	G	A	T	T	C	C
DQB1*0601	G	G	A	T	T	G	C
DQB1*0302	G	G	C	C	T	C	C
DQB1*0502	G	G	G	G	C	G	C
DQB1*0504	G	G	G	G	T	G	C
DQB1*0604	G	G	T	C	C	G	T
DQB1*0605	G	G	T	C	T	G	T
DQB1*0501	G	G	T	G	C	G	T

10.19

Solution:

	63	68	170	76	88	164	231
DQB1*0201	A	G	C	C	A	T	G
DQB1*03031	C	G	A	C	T	C	G
DQB1*0402	C	G	A	G	T	G	C
DQB1*0401	C	T	A	G	T	G	C
DQB1*0603	G	G	A	C	C	G	G
DQB1*03032	G	G	A	C	T	C	G
DQB1*0602	G	G	A	C	T	G	G
DQB1*05031	G	G	A	G	C	G	A
DQB1*05032	G	G	A	G	C	G	*
DQB1*0301	G	G	A	T	T	C	G
DQB1*0601	G	G	A	T	T	G	G
DQB1*0302	G	G	C	C	T	C	G
DQB1*0502	G	G	G	G	C	G	A
DQB1*0504	G	G	G	G	T	G	G
DQB1*0604	G	G	T	C	C	G	G
DQB1*0605	G	G	T	C	T	G	G
DQB1*0501	G	G	T	G	C	G	G

10.20



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/FR 92/01141

International Application No

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.C1. 5 C12Q1/68		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int.C1. 5	C12Q	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT<sup>9</sup></b>		
Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 83, October 1986, WASHINGTON US pages 7836 - 7840 I. LE GALL ET AL. 'Two DR<math>\alpha</math> allelic series defined by exon II-specific synthetic oligonucleotide genomic hybridization: A method of HLA typing?' see abstract see page 7837, left column, line 13 - page 7838, left column, line 25 see page 7840, left column, line 15 - line 33</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: right;">-/--</p>	1
<p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
05 MARCH 1993		24.03.93
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE		LUZZATTO E.R.

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
A	<p>HUMAN IMMUNOLOGY vol. 24, no. 1, January 1989, NEW YORK, USA pages 1 - 14 J.-M- TIERCY ET AL. 'DNA typing of DRw6 subtypes: correlation with DRB1 and DRB3 allelic sequences by hybridization with oligonucleotide probes' see abstract *</p>	1-4
A	<p>IMMUNOGENETICS vol. 32, 1990, NEW YORK, USA pages 231 - 241 T.L.BUGAWAN ET AL. 'Rapid HLA-DPB typing using enzymatically amplified DNA and nonradioactive sequence-specific oligonucleotide probes' see page 232, right column, line 27 - line 58 *</p>	1
A	<p>EP,A,0 412 883 (BERTIN &amp; CIE) 13 February 1991 cited in the application see the whole document</p>	1,7,9
A	<p>EP,A,0 237 362 (CETUS CORPORATION) 16 September 1987 see page 33, line 20 - page 45, line 25</p>	1,6,7
A	<p>WO,A,8 904 875 (CETUS CORPORATION) 1 June 1989 see page 25, line 28 - page 27, line 24</p>	1-4
A	<p>WO,A,8 911 547 (CETUS CORPORATION) 30 November 1989 see page 3, line 32 - page 4, line 22</p>	1-4
A	<p>EP,A,0 103 960 (BIOGEN N.V.) 28 March 1984 see page 32, line 1 - line 30</p>	1
P,X	<p>WO,A,9 210 589 (F. HOFFMANN-LA-ROCHE AG) 25 June 1992 see page 16, line 1 - page 23, line 13</p>	1,6
P,X	<p>WO,A,9 211 389 (F. HOFFMANN-LA-ROCHE AG) 9 July 1992 see page 4, line 33 - page 19, line 12</p>	1,6

-/--

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category °	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
P,X	WO,A,9 208 117 (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.) 14 May 1992 see page 6, line 11 - page 9, line 30; claims -----	1

# ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9201141  
SA 68800

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 05/03/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0412883	13-02-91	FR-A- 2650840	15-02-91
		AU-A- 6180190	11-03-91
		WO-A- 9102087	21-02-91
		JP-T- 4502862	28-05-92
EP-A-0237362	16-09-87	AU-B- 594130	01-03-90
		AU-A- 6996287	17-09-87
		DE-A- 3777213	16-04-92
		EP-A- 0459532	04-12-91
		EP-A- 0459533	04-12-91
		JP-A- 62214355	21-09-87
WO-A-8904875	01-06-89	EP-A- 0439458	07-08-91
WO-A-8911547	30-11-89	AU-A- 3690889	12-12-89
		EP-A- 0417160	20-03-91
		JP-T- 3504325	26-09-91
EP-A-0103960	28-03-84	CA-A- 1295562	11-02-92
		JP-A- 59095889	02-06-84
		US-A- 5169941	08-12-92
WO-A-9210589	25-06-92	AU-A- 9136191	08-07-92
		EP-A- 0514534	25-11-92
WO-A-9211389	09-07-92	AU-A- 9136891	22-07-92
		EP-A- 0515660	02-12-92
WO-A-9208117	14-05-92	NL-A- 9002259	18-05-92

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**